布 万里子*: 褐色ウラミゴケ類とその成分のクロマトグラム

Mariko NUNO*: On some brown Nephromata and chromatograms of their ingredients

Nephroma 属 Nephromium 節に属する帯褐色の葉体を有する地衣類の化学的性質に関しては，若干のミクロ化学的の報告2),6)，があるのみで不明の点が多い。これは各成分が単離して得た純粋の物質ではなく，混合成分のままから得た結晶形であるためにこれ以上の確言はできなかったのである。それでかかる場合には，ペーパークロマトグラフィーを使用し，着色斑を比較する方が便利でありかつより確実である。ところが *Nephroma* 属の含有成分は一二の場合を除き，無色中性の物質で普通の発色剤でそのクロマトグラムの位置を現わすことができない。この不便を打開してくれるものに近ごろ分析学界で愛用されている薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography) がある。この方法は1958年以来，ドイツの Dr. E. Stahl によって広く提唱されてきたもので，目下分析学界の寵児となった。この原理を応用して，当研究室では適当なガラス板（普通に顕微鏡用のスライドを使用）に水の助けを借りて細末シリカゲルを吹きつけ乾燥して薄層を作りその一端に近い場所を原点として可検物溶液の細滴を付着し，適当な溶媒で展開させ，溶媒の前線がガラス板の先端に達する少し以前に展開を中止し，溶媒を蒸発させた後，希硫酸またはアニスアルデヒド硫酸試薬を噴霧して加熱乾燥すると，吸着された物質が有機物であるかぎり，着色した，または暗色の斑点が出現する。この試薬噴霧の前に紫外線を照射して螢光の有無を検するのも効果がある。この方法は地衣の検査にはわが国では初めてであるので，まずその器具の準備につき簡単に説明し，詳細は後文に添えた薄層クロマトグラフィーに関する文献を参照されたい。

実験法

1) 吸着層の調製　硝子板の上に吸着層を作るにあたり，まず広いガラス板（20×20 cm. 程度）の上に酒精で洗浄した清浄なスライド硝子（切放し青色スライドグラス 7.6×2.6 cm または一度に試料を並べて展開を行なう場合には 7.6×7.6 cm の正方形に切ったガラス板，これは二次元展開にも使用）を14枚並べて置き，その上に噴霧瓶を用いて Merck 社製 “Silicagel-G acc. to Stahl” を 5 g と蒸留水 15 cc とをよく混和したものを手早く均等に吹きつける。そしてそのまま水平にしばらく保って風乾し，次いで乾燥機に入れて約 100°C 30分間乾燥する。乾燥し活性化した薄層板はデシケーターに保存する。この方法は，吸着剤に固着剤として焼石膏がはいっているので乾燥後も垂直に保存できて，場所をとらず便利である。

2) 試料の塗布　清浄な毛細管で吸着層の一端より 1—1.5 cm の位置に試料（0.1—

---

* 資源科学研究所. Research Institute for Natural Resources, Shinjuku, Tokyo.

1% 程度のアセトン溶液) を確認の許す限り少量塗布する。通常スライドガラス (幅2.6 cm) に三つは十分点滴可能であるから既知の標準物質と並べて比較ができる。

3) 展開溶媒 i) Ethylacetate: Benzene (1:1) または (1:3). ii) Ethylacetate: cyclohexane (1:2) または (3:7) の混合溶媒 2 種類を用いる。酢酸エチルの量が多くなるほど R.f. 値は上昇する。

4) 展開法 装置は Fig. 1 のとおりである。展開槽として有り合わせの培養シャーレ (ふた外径 9.5 cm) に上記の i) あるいは ii) の混合溶媒を約 6 cc 入れ, これにスライドガラスの下端を約 0.5 cm の深さに浸し直ちにふたをし, さらにガラス鐘などでおおうとなお良い。普通 5.5—6 cm の展開を行なうのに酢酸エチル-ベンゾール (1:2) で6—7分酢酸エチル-チクロヘキサン (3:7) のもので12—13分を要する。展開前に溶媒前線を明らかにするために予め吸着層の上端より約 0.5 cm の所へ針先で鋭く一線をかき, 吸着剤を不連継にしておき, 前線がそこに達した時展開を打切る。(試料の塗布位置および溶媒前線の位置を一定にしておくと R. f. のデータをとる場合に便利である。) 展開に混合溶媒を用いる場合, 同一物質の R.f. 値が周縁部では, 中心より高くなる傾向であり, これは展開時間が早いために展開槽中の溶媒の飽和が不完全なために生ずるといわれ, 過飽和にするためには, 同一溶媒で浸した沪紙を展開槽の内側へはりつけるなどで解決され, R. f. 値の再現性が得られ, 展開時間も短縮されるという。しかし, この場合の如く, 小さなスライドガラスを用いる場合は, いわゆるこの "Stahl の周辺効果" はそれほど問題とはならないように思う。

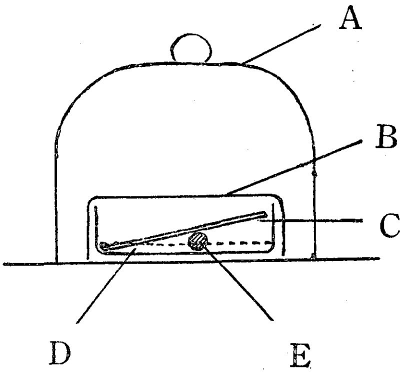


Fig. 1. 薄層クロマトグラフィーの展開装置. A. 硝子鐘. B. シャーレ. C. 吸着層をのせたスライドガラス (傾斜角度は約 20°). D. 展開溶媒. E. ガラス棒またはミクロ試験管.

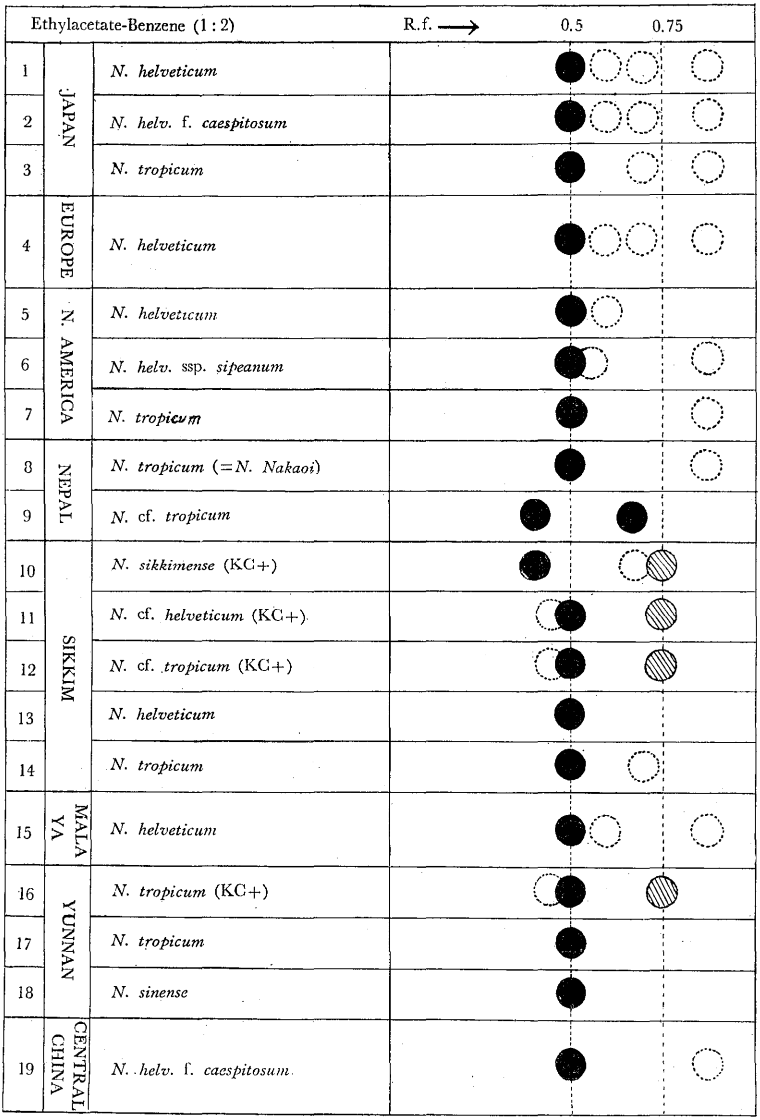
5) 発色確認 i) 螢光観察 ペーパークロマトグラフィーの場合と同様に展開が終ったら, 展開槽から取り出し溶媒を蒸発させて後, 長波長の紫外線下における螢光を観察する。

ii) 試薬の噴霧加熱 螢光の有無を検し終ったら a) もしくは b) の試薬を噴霧して後さらに加熱する。 a) 硫酸 (10 倍に稀釈したもの)。 b) Anisaldehyde の Methanol 溶液 (0.5 cc in 8.5 cc) と, 濃硫酸 1 cc とを用に臨んで混合。

実験結果

Nephroma sikkimense Asahina はその胞子の特異な点とその髄層の反応 KC+紅色で他の種と明瞭に区別されるが, クロマトグラムも独特で, まず U.V. 線照射で紫色の

Tab. 1.



Ethylacetate-Benzene (1 : 2)			R.f. ⟶		0.5			0.75	
1	JAPAN	*N. helveticum*			●	○	○		○
2		*N. helv.* f. *caespitosum*			●	○	○		○
3		*N. tropicum*			●		○		○
4	EUROPE	*N. helveticum*			●	○	○		○
5	N. AMERICA	*N. helveticum*			●	○			
6		*N. helv.* ssp. *sipeanum*			●	○			○
7		*N. tropicum*			●				○
8	NEPAL	*N. tropicum* (=*N. Nakaoi*)			●				○
9		*N.* cf. *tropicum*		●			●		
10	SIKKIM	*N. sikkimense* (KC+)		●			○	▨	
11		*N.* cf. *helveticum* (KC+)		○	●			▨	
12		*N.* cf. *tropicum* (KC+)		○	●			▨	
13		*N. helveticum*			●				
14		*N. tropicum*			●		○		
15	MALAYA	*N. helveticum*			●	○			○
16	YUNNAN	*N. tropicum* (KC+)		○	●			▨	
17		*N. tropicum*			●				
18		*N. sinense*			●				
19	CENTRAL CHINA	*N. helv.* f. *caespitosum*			●				○

螢光を放つ点，R.f. ±0.75 を現わし，次でアニスアルデヒド硫酸と処理すると螢光を放った点は赤色となり，さらに R.f. ±0.4の帯青色の斑点を生ずる (Tab. 1 の 10)。

またこの *N. sikkimense* と混合していた標本で胞子の形状は正しく *N. tropicum* または *N. helveticum* 型のものを分別したが，この部分は髄が KC+ のものと KC− のものとがある。この KC+ のものはそのクロマトグラムの R.f. ±0.75 の螢光を放ち，これにアニスアルデヒド硫酸を作用させると *N. sikkimense* と全く同様の赤色となる。ただしこの際もう一つの点は R.f. ±0.5 で *tropicum-helveticum* 系のものと全く同一の場所である (Tab. 1. の 11, 12)。雲南産の *N. tropicum* 中にも KC+ 紅色の反応を有するものがあり，そのクロマトグラムも全く同一で，この KC+ 紅色の成分こそ螢光を放つ原因というべきであろう (Tab. 1 の 16)。

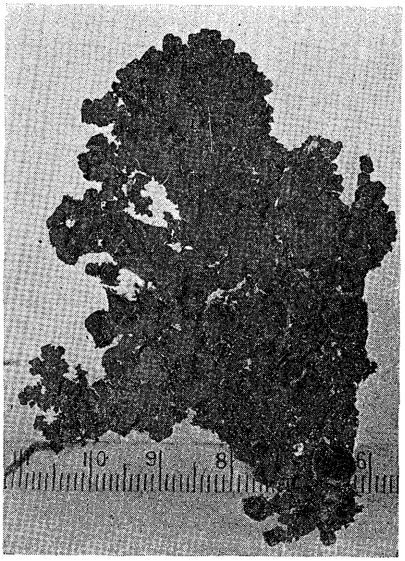


Fig. 2. *Nephroma* cf. *tropicum* Müll. Arg. collected by T. Ogawa in Langmoche (Nepal), showing a dissimilar chromatogram to the typical *N. tropicum*.

検査標本: *N. sikkimense* (KC+); *Sikkim* no. 60501 (typus), no. 60502. *N.* cf. *helveticum* (KC+); *Sikkim* nos. 50501-a, 60522, 60524, 62524-a, 60524-b, 62526-a, 60530. *N.* cf. *tropicum* (KC+); *Sikkim* nos. 60401, 60510, 60523, 60525, 60527, 60529, 60532; *Yunnan* nos. 3602 (herb. W), 11766 (herb. W). *N.* cf. *tropicum* (KC−); *Nepal* no. 9 (Leg. T. Ogawa). *N. helveticum* (KC−); *Sikkim* nos. 60526, 60531. *N. tropicum* (KC−); *Sikkim* nos. 60519, 60529-a.

N. tropicum Müll. Arg., *N. helveticum* Ach. および f. *caespitosum* Asahina は日本・欧州・北米・ネパール・シッキム・マラヤ・雲南・中支を通して R. f. ±0.5 の点を有し，往々 R. f. ±0.7 に第二の斑点を生じ，なおこの後者の前後にさらに不明瞭な斑点を生ずることがある (Tab. 1 の 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 17, 19)。また *N. Nakaoi* Asahina と称するネパール産の標本も同一のクロマトグラムを与えるので，その形態的特徴を考慮すれば *N. tropicum* と同一物である (Tab. 1. の 8)。

検査標本: *N. helveticum*; *Japan* nos. 36729 (herb. As.), 58513 (herb. As.), 51 (herb. As.), 36722 (herb. As.), 54102 (herb. As.), 5855 (herb. As.), 56818 (herb. As.), *Europe* Flora von Österreich. Leg. Simmer (1897), *North America* no. 335 (Leg. H.C. Phillips, Tennessee), *Malaya* no. 62251. (Leg. M. Togashi). *N. helveticum* f. *caespitosum*; *Japan* nos. 5856 (herb. As.), 55103 (herb. As.), 58515-a (herb. As.), 261 (herb. As.), 56616 (herb. As.), 103 (herb. As.), 140 (herb. As.), *Central China* nos. 56 58 (Lushan Leg. Fujikawa). *N. tropicum*; *Japan* no. 61625 (herb. As.), 5786-a (herb. As.), 6181 (herb. As.), 55107-a (herb. As.), 55728 (herb. As.), 58719 (herb. As.), 6183 (herb. As.), 52612 (herb. As.), 3247 (herb. As.), *North America* no. 14 (Tuckerman's Exscc.), *Yunnan* no. 10002 (herb. W). *N. helveticum* ssp. *sipeanum*; *North America* no. 111 (Leg. H.N. Bolander, California). *N. Nakaoi*; *Nepal* no. 74 (Tolo Gompa Khola, Sci. Res. Jap. Exped. to Nepal Himalaya 1952-3).

なお，雲南産の *N. sinense* A. Zahlbr. という標本も見ることができたが，葉体の周辺が深裂し，細長い裂片を現わす特徴があるが，そのクロマトグラムは R.f. ±0.5 に一点を生ずるのみで *tropicum-helveticum* 系のものである (Tab. 1 の 18)。

検査標本：*Yunnan* no. 11751 (herb. W)

以上ウラミゴケ属地衣含有成分に関するクロマトグラフィーを行なったが，含有成分其物についてはさらに研究を行なうつもりである。終りに臨み，本研究に当って終始ご指導ご鞭達を賜わりました朝比奈泰彦博士に厚く御礼申し上げますと共に，貴重な標本を貸与して下った Wien の Naturhistorisches Museum の Dr. K.H. Rechinger 氏，America の Smithsonian Institution の Dr. M.E. Hale 氏並びに Sikkim の標本を採集された富樫誠氏に厚く感謝いたします。

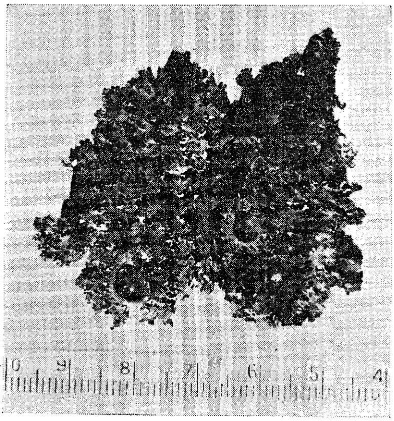


Fig. 3. *Nephroma sinense* A. Zahlbr. No. 11751 ex Herb. Mus. Hist. Nat. Vindb.

*　*　*　*　*

In a paper published in this Journal⁶⁾ Dr. Asahina advanced an opinion that *Nephroma tropicum* Müll. Arg. and *N. helveticum* Ach., which are often believed to be identical, can be well differentiated morphologically. As for the chemism of both species it is nothing known in detail. This is due to the fact, that the chemical substances contained in them are neither depsides nor depsidones and give no colour reaction with usual reagents, preventing the application of the paper partition chromatography. But this defect is avoided by the use of the thin layer chromatography, which showed recently a sudden development. The

"thin layer" was prepared by coating usual glass slides of microscopy with "Silicagel-G, acc. to Stahl-E. Merck." The sample to be examined was applied on the starting line near the one edge by means of a capillary tube, dried and the lower edge was inserted in the solvent (for example, ethylacetate: benzene =1:2) in a chamber saturated with the same solvent vapour. Before the front line of the solvent reaches the upper edge of the plate, it was separated from the solvent, dried in the air, irradiated with the U.V. ray and marked a fluorescent spot, if any. Then the plate was sprayed with 10% sulphuric acid and dried (in a chamber if necessary). In some cases instead of 10% sulphuric acid a methanolic solution of anisaldehyde mixed with conc. sulphuric acid was used.

All specimens of *N. helveticum* and *N. tropicum*, except a few (s. below), gave a conspicuous chromatogram at R.f. ±0.5. In some cases several indistinct spots appear, of which the spot R.f. ±0.7 is more or less distinct.

N. sikkimense Asahina, which distinguishes itself from *N. tropicum* as well as *N. helveticum* by the longer, cylindrical spores and medullary reaction KC+red, exhibits a characteristical chromatogram. On irradiation with U.V. ray a fluorescent spot appears at R.f. ±0.75, which becomes red on heating with anisaldehyde-sulphuric acid, giving at the same time another blue violet spot R.f. ±0.4, lower than the common spot of *N. tropicum* and *N. helveticum*.

N. Nakaoi Asahina (Fauna and Flora of Nepal Himalaya: Scientific Results of the Japanese Expedition to Nepal Himalaya, 1952–3, p. 45) gave a spot R.f. ± 0.5 and indistinct one. In consideration of its external appearance there is no reason to separate it from *N. tropicum* Müll. Arg.

Another Himalayan specimen No. 9 collected by Prof. Ogawa at Lengmoche in Nepal, which may be reffered to *N. tropicum* and KC−, exhibited two spots R.f. ±0.4 and R.f. ±0.7, corresponding to those of *N. sikkimense*. But contray to the latter specimen the higher spot gave no fluorescence on irradiation with U.V. rays.

Together with *N. sikkimense* there are some fragments of *Nephroma* species, which from their morphological aspects must be assigned either to *N. helveticum* or *tropicum*, unless it exhibits a medullary reaction KC+red. By the thin layer chromatography, these samples gave two spots R.f. ± 0.5 and R.f. ±0.75. As the latter spot fluoresces on irradiation with U.V. rays becomes red by the anisaldehyde-sulphuric acid solution and the R.f. value identical with that of *N. sikkimense*, the substance KC+ contained in the both species must be identical. Also *N. tropicum* from Yunnan exhibited the medullary reaction KC+ red and gave just the same chromatograms with those from Sikkim-Himalaya. *N. sinense* A. Zahlbr., which distinguishes itself by the exceedingly deep lacerated margins, gave a single spot at R.f. ±0.5, a common spot of *N. tropicum-helveticum* group.

The author express her sincere thanks to Dr. Rechinger (Wien), who took the trouble to send her Yunnan specimens of Nephromata on loan. Also she is much obliged to Dr. Hale (Washington), who sent her several North American specimens of Nephromata.

文献

1) Bachmann, O.: Dünnschichtchromatographische Trennung von Flechten Säuren der β-orcin Gruppe. (Vorabdruck Österr. Bot. Zeitschr.) 2) Wetmore, C.M.: The Lichen Genus *Nephroma* in North and Middle America. Publ. Mus., Michigan S. Univ. 11. 1960. 3) Pastuska, G.: Die Kieselgelschicht von Phenolen und Phenolcarbonsäuren. z. Analyt. Chem. **355**: 197, 1961. 4) Stahl, E.: Neue Anwendungsgebiete der Dünnschicht-Chromatographie. Angew. Chem. **646**: 73, 1961. 5) Wollish, E.G., M. Schmall & M. Haurylyshyn: Thin-layer Chromatogryphy. Anal. Chem. **1138**: 33, 1961. 6) Asahina, Y.: Lichenologische Notizen (§. 185). Journ. Jap. Bot., **257**: 37, 1962. 7) Ertel, H. & L. Horner: Zwei Universalreagentien zur Dünnschichtchromatographie. J. Chromatog. **268**: 7, 1962. 8) Lees, T.M. & P.J. DeMuria: A simple method for the preparation of thin layer chromatography plates. J. Chromatog. **108**: 8, 1962. 9) Stahl, E.: Dünnschicht-Chromatographie. z. Analyt Chem. **303**: 181, 1962t. 10) Huneck, S.: Triterpene III. Die Anwendung von gewachsenem Aluminiumoxyd als selbsttragendes Adsorbens in der Dünnschichtchromatographie von Triterpenen. J. Chromatog. **561**: 7, 1962. 11) 美間博之・北森信之: 薄層クロマトグラフィーの油脂への応用. 油脂. **91** (11): 15, 1962. 12) 原 昭二: 薄層クロマトグラフィー解説. 薬局. **1373** (11): 13, 1962. 13) ————: 薄層クロマトグラフィーの実際. 和光純薬時報. No. 1: 32, 1963. 14) ————: 薄層クロマトグラフィーの展望. 分析化学. **199** (2): 12, 1963. 15) ————: 薄層クロマトグラフィー. 自然 **93** (2) 1963. 16) ————: ステロイドの T.L. C. 化学の領域. No. 3: 17, 1963. 17) 石川正幸: 薄層クロマトグラフィーの実験操作法. 化学の領域. No. 3: 17, 1963. 18) 美間博之: 結合剤を用いない T.L.C. 化学の領域. No. 3: 17, 1963. 19) 橋本庸平: 薄層クロマトグラフィー. 広川最店 1963.